

JP 10175861

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2002 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

012005391 **Image available**
WPI Acc No: 1998-422301/ 199836
XRAM Acc No: C98-126956

New lignan derivatives are NF-kappa B activation inhibitors - used as gene expression controlling agents for e.g. interleukins in treatment of e.g. inflammation, cancer metastasis and HIV

Patent Assignee: KAO CORP (KAOS)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 10175861	A	19980630	JP 96335396	A	19961216	199836 B

Priority Applications (No Type Date): JP 96335396 A 19961216

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 10175861	A	11	A61K-031/365		

Abstract (Basic): JP 10175861 A

Lignan derivatives of formula (I) are new. R1-R4 = H, OH, alkyl, hydroxyalkyl or alkoxy.

USE - (I) are used as gene expression controlling agents for IL-1, -2, -6, -8, -12, IFN- beta , iNOS, TNF, COX-2, ELAM-1, ICAM-1, VCAM-1, MMP-9, G-CSF and/or GM-CSF. (I) are used as anti-HIV agents, antiinflammatory agents, adult disease preventing and improving agents and as cancer metastasis inhibiting agents (all claimed).

Dwg.0/0

Title Terms: NEW; LIGNAN; DERIVATIVE; KAPPA; ACTIVATE; INHIBIT; GENE; EXPRESS; CONTROL; AGENT; TREAT; INFLAMMATION; CANCER; METASTASIS; HIV
Derwent Class: B02

International Patent Class (Main): A61K-031/365

International Patent Class (Additional): A61K-031/36; C07D-493/04

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B06-A03; B14-C03; B14-G01B; B14-H01; B14-L01; B14-L06

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-175861

(43) 公開日 平成10年(1998) 6月30日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I
A 6 1 K 31/365	ABD	A 6 1 K 31/365 ABD
31/36	ABE	31/36 ABE
	ABG	ABG
	ABX	ABX
	ACD	ACD

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 11 頁) 最終頁に続く

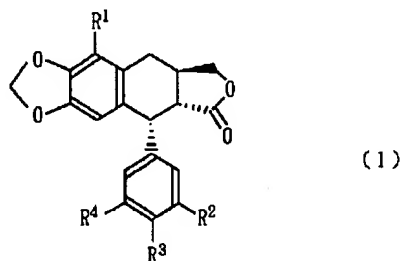
(21) 出願番号	特願平8-335396	(71) 出願人	000000918 花王株式会社 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番10号
(22) 出願日	平成8年(1996)12月16日	(72) 発明者	村瀬 孝利 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社 社研究所内
		(72) 発明者	長谷 正 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社 社研究所内
		(72) 発明者	時光 一郎 栃木県芳賀郡市貝町赤羽2606 花王株式会社 社研究所内
		(74) 代理人	弁理士 有賀 三幸 (外3名)

(54) 【発明の名称】 NF- κ B 活性化抑制剤

(57) 【要約】

【解決手段】 一般式(1)で表されるリグナン類を有効成分とするNF- κ B活性化抑制剤、遺伝子発現調節剤、抗ヒト免疫不全ウイルス剤、炎症予防・改善剤、成人病予防・改善剤及び癌転移抑制剤。

【化1】



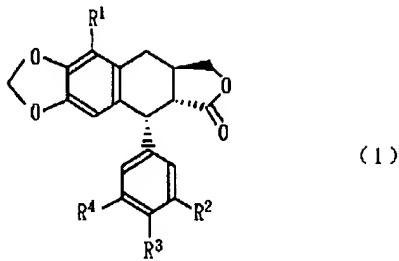
(式中、R¹、R²、R³ 及び R⁴ は同一又は異なって水素原子、ヒドロキシ基、アルキル基、ヒドロキシアルキル基又はアルコキシ基を示す)

【効果】 優れたNF- κ B活性化抑制作用、遺伝子発現調節作用を有する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 一般式(1)

【化1】



(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 及び R^4 は同一又は異なって水素原子、ヒドロキシル基、アルキル基、ヒドロキシアルキル基又はアルコキシ基を示す)で表されるリグナン類を有効成分とする NF- κ B 活性化抑制剤。

【請求項2】 請求項1記載のリグナン類を有効成分とするインターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-2 (IL-2)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-8 (IL-8)、インターロイキン-12 (IL-12)、インターフェロン- β (IFN- β)、NO合成酵素 (iNOS)、腫瘍壊死因子 (TNF)、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2)、ELAM-1、ICAM-1、VCAM-1、マトリクスメタロプロテアーゼ-9 (MMP-9)、G-CSF、GM-CSFより選ばれる1又は2以上の物質の遺伝子発現調節剤。

【請求項3】 請求項1記載のリグナン類を有効成分とする抗ヒト免疫不全ウイルス剤。

【請求項4】 請求項1記載のリグナン類を有効成分とする炎症予防・改善剤。

【請求項5】 請求項1記載のリグナン類を有効成分とする成人病予防・改善剤。

【請求項6】 請求項1記載のリグナン類を有効成分とする癌転移抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、抗ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 剤、炎症予防・改善剤、成人病予防・改善剤、癌転移抑制剤として有用な NF- κ B (Nuclear Factor-Kappa B) 活性化抑制剤、遺伝子発現調節剤に関する。

【0002】

【従来の技術】発生、分化、増殖、恒常性の維持などの高次の生命現象は、ある特定の遺伝的プログラムに従って正確に行われるが、それは個々の細胞における特異的な遺伝子の発現調節を通した細胞レベルにおける活性化、分化、増殖によって制御されている。これらの変化は遺伝情報の発現が起こるべき細胞へ、その外界からサイトカインやホルモンなどの刺激が加わり、細胞膜上の受容体に結合することにより始まり、種々の生化学的反

応を経て最終的に核にシグナルを伝達し、遺伝子発現の変化を引き起こす。このような遺伝子発現の制御は主として遺伝子の転移レベルで行われていることが知られている。

【0003】外界からの刺激によって発現誘導される遺伝子群は、刺激により迅速に再活性化され得る状態にある。どの遺伝子が選択的に活性化されるかは遺伝子の発現制御領域に存在する特別な塩基配列、及びこれらのシスエレメントに特異的に結合する転写調節因子が存在するか否かによって決定される。つまり外界からの刺激によって転写調節因子が量的又は質的に活性化すれば遺伝子の発現が起こる。

【0004】転写調節因子のうち NF- κ B は、p50 及び p65 の2種類のサブユニットから成る蛋白質であり、非刺激時には阻害蛋白質 I- κ B と結合して細胞質に存在している。この細胞質に IL-1 や TNF- α などによる刺激が加わると、この刺激によって活性化されたキナーゼにより、I- κ B が不活性化され、放出された NF- κ B が核へ移行して転写の活性化が起こると考えられている。

【0005】NF- κ B により活性化される、すなわち発現制御配列に NF- κ B の結合するシスエレメントを持つ遺伝子は、IL-1 (Interleukin-1)、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、IFN- β (Interferon- β)、iNOS (Inducible nitric oxide synthase)、G-CSF (Granulocyte colony stimulating factor)、GM-CSF (Granulocyte macrophage colony stimulating factor)、TNF- α (Tumor necrosis factor α)、COX-2 (Cyclooxygenase-2) のような炎症性サイトカイン、ELAM-1 (E-Selectin)、ICAM-1 (CD54)、VCAM-1 (CD106) のような細胞接着、細胞浸潤、癌転移の過程に重要な細胞接着分子などに関するものが多いことが知られている。また、MMP-2, 9 (Matrix metalloproteinase) のようなガン細胞の血管外への浸潤、転移に深く関与する酵素の活性化にも NF- κ B の活性化が深く関与していることが知られていることから、NF- κ B 活性化抑制物質は抗炎症剤、癌転移抑制剤として期待されている。従って、NF- κ B 活性化抑制剤が有効に発現調節する遺伝子として、IL-1、IL-2、IL-6、IL-8、IL-12、TNF、IFN、iNOS、G-CSF、GM-CSF、COX-2、ELAM-1、ICAM-1、VCAM-1、MMP-9 等が挙げられる。また、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) は宿主細胞の NF- κ B によりその転写が活性化され、ウイルスの増殖と感染の拡大が進むと考えられており、従って、NF- κ B の活性化抑制物質は、HIV 感染症 (AIDS) の治療に有効であると期待されている (実験医学: 9巻16号, 68-, 199: Annu. Rev. Immunol.: 12巻, 141-, 1994, Advances in Immunology: 58巻, 1-, Science: 265巻,

956-, 1994)。

【0006】成人病の一つである粥状動脈硬化発生の初期には、細胞内に大量のエステル化コレステロールを蓄積した泡沫細胞と呼ばれる単球マクロファージ由来の細胞の、血管内皮下での局所的な集簇が認められる。また、粥状動脈硬化巣にはTリンパ球の存在も知られている。このような動脈硬化巣においてもNF- κ Bが活性化されていることが知られており、NF- κ Bの活性化は動脈硬化発症過程における重要な初期ステップとして認識されている(J. Clin. Invest., 97, 1715-, 1996)。また、肝炎、腎炎、関節リウマチ組織においてもNF- κ Bの活性化が誘導されていることも報告されている。従って、NF- κ B活性化抑制剤は、動脈硬化や、肝炎、腎炎、関節リウマチ等の成人病の予防・改善剤として有効である。

【0007】このように、動脈硬化症や肝炎のような多くの成人病や各種の炎症、ウイルス性疾患、癌の転移にはNF- κ Bの活性化が極めて重要な役割を果していることが明らかとなっており、また、理論的にも、細胞実験レベルにおいても動物実験レベルにおいてもNF- κ B活性化抑制物質がこれら疾患の予防・改善に有効であることが認識されるに至っていることから、本出願人を含め多くの研究者がこれら疾患の制御を目的にNF- κ B活性化抑制物質の探索を行っている。このような疾病制御の観点から、これまでにNF- κ Bの活性化を抑制する物質の探索が行われ、本出願人によって先に報告された没食子酸誘導体(特願平7-215983号)、N-アセチルシステインやピロリジンジチオカーボネート(The Journal of Immunology, 1994, 153:2681-)、アスピリンやサリチル酸ナトリウム(Science, 1994, 265(12):956-)、ベンゾキノン誘導体(特開平7-297860号、特開平7-291859号公報)、バナジウムコンプレックス(DE4336642)、ペルバナデート(J. Biological chem., 270(18)10631-10639, 1995)、フェニルアルシンオキシド(J. Biological chem., 270(18)10631-10639, 1995)、サイクリックイミド誘導体(W09501348)、トシルフェニルクロロメチルケトン、ジイソクマリン、 α -トコフェリルサクシネート、ペントキシフィリン、ベンゾキノン誘導体(特開平7-291860号公報)などが報告されている。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、高い効力を有するNF- κ Bの活性化抑制剤及びこの作用に基づく優れた遺伝子発現調節剤、抗ヒト免疫不全ウイルス剤、炎症予防・改善剤、成人病予防剤、癌転移抑制剤を提供することにある。

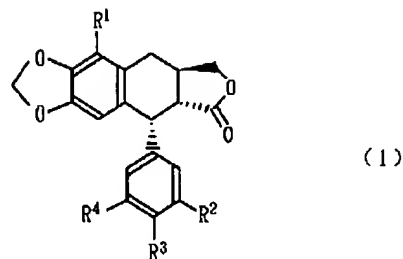
【0009】

【課題を解決するための手段】このような実情に鑑み、本発明者は鋭意研究を行った結果、特定のリグナン類が優れたNF- κ B活性化抑制作用を有することを見出し、本発明を完成した。

【0010】すなわち、本発明は次の一般式(1)

【0011】

【化2】



【0012】(式中、R¹、R²、R³及びR⁴は同一又は異なって水素原子、ヒドロキシル基、アルキル基、ヒドロキシアリル基又はアルコキシ基を示す)で表されるリグナン類を有効成分とするNF- κ B活性化抑制剤、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-6(IL-6)、インターロイキン-8(IL-8)、インターロイキン-12(IL-12)、インターフェロン- β (IFN- β)、NO合成酵素(iNOS)、腫瘍壊死因子(TNF)、シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)、ELAM-1、ICAM-1、VCAM-1、マトリクスメタロプロテアーゼ-9(MMP-9)、G-CSF、GM-CSFより選ばれる1又は2以上の物質の遺伝子発現調節剤、抗ヒト免疫不全ウイルス剤、炎症予防・改善剤、成人病予防剤及び癌転移抑制剤を提供するものである。

【0013】

【発明の実施の形態】リグナン類は植物においてはヒノキ科のアスナロ(Thujaopsis dolabrata)(Chem. Pharm. Bull. 20(6)1150-1155(1972))などに見出されている他、種々の合成法が報告されており(Natural Product Report, 183-205(1995))、また、これまでに一部のリグナンに抗ヘルペスウイルス活性、抗サイトメガロウイルス活性や癌細胞(mouse leukemia, human lung carcinoma, human colon carcinoma)増殖抑制活性(Plant a Med. 59, 246-249(1993))、血小板へのPAF(Platelet activating factor)の結合阻害(Natural Product Report, 183-205(1995))などが報告されているが、そのNF- κ B活性化抑制作用については全く知られていない。

【0014】本発明で用いられるリグナン類は、前記一般式(1)で表されるものであり、式中R¹~R⁴は同一又は異なって水素原子、ヒドロキシル基、アルキル基、ヒドロキシアリル基又はアルコキシ基を示し、アルキル基としては炭素数1~10のものが好ましく、例えばメチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基などの直鎖又は分岐鎖のものが挙げられ

る。ヒドロキシアルキル基としては、炭素数1~10の直鎖又は分岐鎖のものが好ましく、例えばヒドロキシエチル基などを挙げることができる。また、アルコキシ基としては炭素数1~10の直鎖又は分岐鎖のものが好ましく、例えばメトキシ基、エトキシ基、*n*-プロピルオキシ基、イソプロピルオキシ基、*n*-ブチルオキシ基、*sec*-ブチルオキシ基、*tert*-ブチルオキシ基、ペンチルオキシ基、ヘキシルオキシ基、ヘプチルオキシ基、オクチルオキシ基、ノニルオキシ基、デシルオキシ基等を挙げることができる。これらのうち、一般式

(1)において R^1 が水素原子、ヒドロキシル基又は炭素数1~3のアルコキシ基であり、 R^2 、 R^3 及び R^4 がヒドロキシル基又はメトキシ基で表されるものが特に好ましい。

【0015】このようなリグナン類(1)は、例えばアスナロ(主に葉部、小枝部)から抽出することができる。抽出は、アスナロ又はその乾燥末を水、有機溶媒(石油エーテル、*n*-ヘキサン、シクロヘキサン、四塩化炭素、トルエン、ベンゼン、ジクロロメタン、クロロホルム、エーテル、酢酸エチル、ブタノール、アセトン、プロパノール、エタノール、メタノール、ピリジン、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、ブチレングリコール等)、水性アルコール等を用い、通常3~70℃で抽出処理することにより行う。

【0016】アスナロ原体からの好ましい具体的抽出例としては、アスナロの乾燥粉碎物100gをエタノール1リットルに浸漬し、室温で時々攪拌しながら7日間抽出を行い、得られた抽出液をろ過し、ろ液を5℃で3日間静置した後、再度ろ過して上澄みを得る方法が挙げられる。次いで得られた抽出液から溶媒を留去して得られた残渣を、適宜メタノール、エタノール、酢酸エチル等の溶媒に溶解し、更に水、メタノール、エタノール、酢酸エチル、クロロホルム、ジクロロメタン、ヘキサン、アセトン、ベンゼン等を溶出溶媒として、アンバーライトXAD-2、ダイアイオンHP-20、TSKゲルHW-40等の親水性ポリマーやセファデックスLH-20等のセファデックス、逆相系シリカゲルやシリカゲル、セルロース等を担体に用いたカラムクロマトグラフィーに付し、薄層クロマトグラフィーなどで目的成分を確認しながら分画することにより目的物を得ることができる。また、場合によりベンゼン、エーテル、ヘキサン、アセトン、メタノール、エタノール、水等の適当な溶媒を用いて再結晶することにより精製してもよい。

【0017】また、文献記載の方法(Natural Product Report, 183-205(1995)等)により種々の誘導体を合成することができ、その由来は特に限定されるものではない。

【0018】本発明のNF- κ B活性化抑制剤には、リグナン類に加えて、既存の抗炎症剤、抗アレルギー剤、抗ヒスタミン剤等の薬物を任意に組合わせて配合するこ

とができ、また、通常用いられる賦形剤及びその他の添加剤とともに任意の形態に製剤化される。かかる賦形剤、添加剤の例として、固形状のものとしては乳糖、カオリン、ショ糖、結晶セルロース、コーンスターチ、タルク、寒天、ペクチン、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、レシチン、塩化ナトリウム等が挙げられ、液状のものとしてはグリセリン、落花生油、ポリビニルピロリドン、オリーブ油、エタノール、ベンジルアルコール、プロピレングリコール、水等が挙げられる。

【0019】本発明の医薬は、その剤型に応じて経口、経腸、外用、注射、点眼、点鼻、吸入、経粘膜等いずれの経路によってもヒトに投与することができる。またその投与量は、年齢、体重、性別、症状、治療効果、投与方法、処理時間等の種々の要因によって異なり、特に限定されないが、経口投与の場合は通常大人1人当たり1回に0.1~2000mg、特に10~400mgの範囲を1日1回~数回に分けて投与することが好ましい。また、非経口投与の場合は、通常大人1人当たり1回に0.1~2000mg、特に10~400mgの範囲を1日1回~数回投与することが好ましい。

【0020】本発明の医薬の剤型としては特に限定されず、例えば錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、坐剤、トロリー剤、シロップ剤、乳液、液剤(ドリンク剤)、軟ゼラチンカプセル、クリーム、ゲル、ペースト、スプレー、注射剤等が挙げられる。錠剤の形態にする場合は、担体としては、この分野で公知のものを広く使用できる。これには、例えば澱粉、乳糖、ショ糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類、尿素等の賦形剤；水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖、澱粉液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、セラック、メチルセルロース、リン酸カリウム、ポリビニルピロリドン等の結合剤；乾燥澱粉、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセライド、澱粉、乳糖等の崩壊剤；白糖、ステアリン、カカオバター、水素添加油等の崩壊抑制剤；ラウリル硫酸ナトリウム、第4級アンモニウム塩等の吸収促進剤；グリセリン、澱粉等の保湿剤；澱粉、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸等の吸着剤；ステアリン酸塩、ホウ酸末、精製タルク、ポリエチレングリコール等の滑沢剤等が挙げられる。更に錠剤は必要に応じて通常の剤皮を施した錠剤、例えば糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶包錠、フィルムコーティング錠あるいは二重錠、多層錠とすることができる。

【0021】丸剤の形態にする場合には、担体としてはこの分野で公知のものを広く使用でき、これには、例えば澱粉、乳糖、ブドウ糖、カカオ脂、硬化植物油、カオリン、タルク等の賦形剤；アラビアゴム末、トラガント

末、ゼラチン、エタノール等の結合剤；ラミナランカンテン等の崩壊剤等が挙げられる。

【0022】坐剤の形態にする場合は、担体としてはこの分野で公知のものを広く使用でき、これには例えばカカオ脂、ゼラチン、ポリエチレングリコール、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、半合成グリセリド等を挙げることができる。

【0023】注射剤として調製する場合は、液剤及び懸濁剤は殺菌され、かつ血液と等張であることが望ましく、これら液剤、懸濁剤及び乳剤の形態にする場合は、希釈剤として、この分野において慣用されているものを利用することができる。例えば水、エチルアルコール、プロピレングリコール、エトキシ化イソステアリアルアルコール、ポリオキシエチレン化イソステアリアルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等を挙げることができる。尚、この場合、等張性の水溶液を調製するに十分な量の食塩、ブドウ糖、グリセリン等を医薬製剤中に含有せしめてもよく、また通常の溶解補助剤、緩衝剤、無痛化剤等を添加してもよい。更に必要に応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤や他の医薬品を医薬製剤中に含有せしめてもよい。

【0024】また、噴霧剤の形態にする場合には、分散剤及び噴射剤はこの分野で公知のものを広く使用でき、分散剤としては例えば大豆レシチン、卵黄レシチン類、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸等の脂肪酸、ソルビタントリオレート、ソルビタンモノオレート等のソルビタン類等を用いることができる。また噴射剤として例えばフレオン11、フレオン12、フレオン114等の通常不燃性液化ガスを用いることができる。

【0025】軟膏の形態にする場合にもこの分野で公知のものを広く使用でき、例えば水、エタノール、イソプロピルアルコール、グリセリン、ポリエチレングリコール、ソルビトール、ポリビニルアルコール等の多価アルコール、動物性油脂、植物性油脂、鉱物油、硬化油、ミツロウ等のワックス、液状パラフィン、パラフィンロウ等の高級炭化水素、ステアリン酸等の脂肪酸、乳化剤、アニオン界面活性剤、カチオン界面活性剤、両性界面活性剤といった界面活性剤、キサンタンガム、アルギン酸ナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシビニルポリマー等の水溶性高分子化合物等を使用することができる。また、色素、保存剤、香料等も必要に応じて配合してもよい。

【0026】リグナン類(1)が製剤中に配合されるべき量としては特に限定されず、広範囲に適宜選択されるが、通常製剤中1～70重量%、特に1～30重量%であるのが好ましい。

【0027】

【発明の効果】本発明のリグナン類は優れたNF- κ B活性化抑制作用を有し、遺伝子発現調節剤、抗炎症剤、抗ヒト免疫不全ウイルス剤、癌転移抑制剤、炎症予防・

改善剤、成人病予防剤として有用である。従って、これを有効成分として含有する製剤は、そのNF- κ B活性化抑制作用、遺伝子発現調節作用に基づき、ヒト免疫不全感染症(AIDS)、気管支炎、アレルギー性鼻炎、関節炎、腎炎、肝炎、乾せん、蕁麻疹、接触皮膚炎、アトピー性皮膚炎、UV炎症、関節リウマチ、喘息、動脈硬化、各種癌転移等の予防・治療に広く用いることができる。

【0028】

【実施例】次に、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0029】製造例1

アスナロ乾燥粉碎物(180g)をエタノール1Lに浸漬し、室温において時々攪拌しながら7日間抽出を行い、得られた抽出液を濾過し、濾液を5℃において3日間静置した後、再度濾過し、上澄みを得た。次に溶媒を留去して得られた残渣(2.4g)をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン：酢酸エチル、CHCl₃：CH₃OH、H₂O：CH₃OH)、高速液体クロマトグラフィー(YMC-ODS S-10、YMC社製)に供し、化合物1(一般式(1)において、R¹=H、R²=R³=R⁴=OCH₃)25mgを得た。

【0030】製造例2

製造例1と同様にして、化合物2(一般式(1)において、R¹=OH、R²=R³=R⁴=OCH₃)10mgを得た。

【0031】製造例3

製造例1と同様にして、化合物3(一般式(1)において、R¹=R²=R³=R⁴=OCH₃)21mgを得た。

【0032】製造例4

製造例1と同様にして、化合物4(一般式(1)において、R¹=H、R²=R⁴=OCH₃、R³=OH)15mgを得た。

【0033】試験例1 NF- κ B活性化抑制試験：

(a-1) ケラチノサイトの調製

正常ヒトケラチノサイトをT-25フラスコで培養し、サブコンフルエントに達した時点で成長因子類を含まない培地(K-110(-))(極東製薬(株)製)(5ml)で1度洗浄し、K-110(-)(5ml)で1日培養する。その後新たなK-110(-)に置き換え、刺激物質(最終濃度IL-1 α :1.25ng/ml、TNF α :1.25ng/ml又はLPS(リボポリサッカライド):10 μ g/ml)を添加し、更に1時間培養する。培養後、細胞をPBS(-)で洗浄し、下記の方法により核蛋白質の抽出を行った。尚、被験物質(最終濃度100nM)はUVB(紫外線)照射の15時間前に細胞に添加した。

【0034】(a-2) UVB照射ケラチノサイトの調製

正常ヒトケラチノサイトをT-25フラスコで培養し、

サブコンフルエントに達した後、成長因子類を含まない培地 (K-110(-)) で1度洗浄し、K-110 (-) (5ml) で1日培養する。その後PBS (-) (5ml) で2度洗浄し、PBS (-) (2ml) 存在下、UVB (15mJ/cm²) を照射する。照射後PBSを除去し、K-110 (-) を5ml添加し、2時間培養する。培養後細胞をPBS (-) で洗浄し、下記の方法により核蛋白質の抽出を行った。尚、被験物質 (最終濃度100nM) はUVB照射の15時間前に細胞に添加した。

【0035】(b) 血管内皮細胞の調製

コラーゲン (I) コートしたT-25フラスコ内にてE-300培地 (極東製薬 (株) 製) 中でコンフルエントとなった正常ヒト臍帯由来血管内皮細胞に被験物質 (10nM) を添加する。15時間後に刺激物質 (最終濃度IL-1α:1.25ng/ml、TNFα:1.25ng/ml又はPMA (ホルボール12-ミリステート13-アセテート):10ng/ml) を添加し1時間培養する。培養液を除去した後PBS (-) にて洗浄し、下記の方法により核蛋白質の抽出を行った。

【0036】(c) 核蛋白質の抽出

培養液除去後PBS (-) にて洗浄した細胞に、バッファA (10mM HEPES-NaOH (pH7.9), 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 1.0mMジチオスレイトール (DTT), 0.5mMα-フェニルメタンシルホニルフロライド (PMSF), 2μg/mlアプロチニン, 2μg/mlペプスタチン) 1mlを加え、セルスクレイパーを用いて細胞を剥離回収する。遠心処理 (12000rpm, 10分間) し、上清を除去した後バッファB (バッファA+0.1% Triton X) 80μlを添加し、ピペッティングにより細胞を懸濁させ、氷上に10分間放置する。遠心処理 (14000rpm, 10分間) 後、上清を除去し、バッファC (20mM HEPES-NaOH (pH7.9), 1.5mM MgCl₂, 420mM NaCl, 1.0mM DTT, 0.5mM PMSF, 0.2mM EDTA, 2μg/mlアプロチニン, 2μg/mlペプスタチン, 25%グリセロール) 70μlを加え、ピペッティングにより細胞を懸濁させ、氷上に30分間放置する。遠心処理 (15000rpm, 20分間) 後、上清を核蛋白抽出物として回収する。核蛋白質は、1mg/ml に調整し、ゲルシフトアッセイに用いた。ゲルシフトアッセイは基本的にはProm

ega社製のゲルシフトアッセイシステムを用いて行った。1mg/mlの核蛋白質 (2μl), H₂O (4又は5μl), 結合バッファ (50mM Tris-HCl (pH7.5), 5.0mM MgCl₂, 250mM NaCl, 2.5mM DTT, 2.5mM EDTA, 20%グリセロール, 0.25mg/mlポリ (dI-dC)ポリ (dI-dC)) (2μl), 競合物質 (NF-κBオリゴヌクレオチド)、非競合物質 (OCT1オリゴヌクレオチド) (1又は0μl) を混合し、室温で10分間放置する。その後、予めT4-ポリヌクレオチドキナーゼにより³²Pラベルした下記³²P-NF-κBコンセンサス オリゴヌクレオチド (1μl) を添加、更に室温で20分間放置し、その後ゲルローディングバッファ (250mM Tris-HCl (pH7.5), 0.2% BPB, 40%グリセロール) (1μl) を加え反応を停止させる。

【0037】NF-κBコンセンサス オリゴヌクレオチド

5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAAGGC-3'
3'-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG-5'

【0038】次に0.5X TBE (トリス/ホウ酸/EDTA) バッファ中、ポリアクリルアミドゲル (5%) 電気泳動に供し、ゲルを乾燥後、オートラジオグラフィを行い、DNAプローブの移動度の変化からNF-κB活性化抑制効果を評価した。評価は、バイオイメージングアナライザーBAS2000 (フジフィルム社製) により各バンドの放射活性を測定し、IL-1無刺激のときのNF-κBの放射活性の値、IL-1のみで刺激した場合の放射活性の値から、各被験物質で処理した場合のNF-κBの活性化の程度をNF-κB活性化抑制率として算出することにより行った。結果を表1に示す。尚、シフトしたバンドが目的のものであるか否かを検証するため、非標識プローブによる競争実験を同時に行った。

【0039】

【表1】

被験物質	IL-1 α 刺激時* ¹	TNF α 刺激時* ¹	LPS 刺激時* ¹	UVB 刺激時* ¹	IL-1 α 刺激時* ²	TNF α 刺激時* ²	PMA 刺激時* ²
化合物 1	81					75	
化合物 2	77					78	
化合物 3	85	88	90	92	80	80	51
化合物 4	74					80	
IL-1 α (-)	100				100		
IL-1 α (+)	0				0		
TNF α (-)		100				100	
TNF α (+)		0				0	
LPS (-)			100				
LPS (+)			0				
PMA (-)							100
PMA (+)							0
UVB (-)				100			
UVB (+)				0			

* 1 : ケラチノサイトにおける刺激時

* 2 : 血管内皮細胞における刺激時

【0040】この結果、本発明のリグナン類が優れたNF- κ B活性化抑制作用を有することが判明した。

【0041】試験例2 RT-PCRによるmRNA発現量の解析：

ヒトケラチノサイトに紫外線を照射する実験系において各種遺伝子のmRNAの発現に対するリグナン類の効果について評価した。

(a) ケラチノサイトの調製

正常ヒトケラチノサイトをT-25フラスコで培養し、サブコンフルエントに達した後成長因子類を含まない培地(K-110(-)) (極東製薬(株)製)で1度洗浄し、K-110(-) (5ml)で1日培養する。その後PBS(-) (5ml)で2度洗浄し、PBS(-) (2ml)存在下、UVB (15mJ/cm²)を照射する。照射後PBSを除去、K-110(-)を5ml添加し、4時間培養する。4時間後細胞をPBS(-)で洗浄し、Isogen (1ml) (和光純薬製)を加え、常法に従いトータルRNAを抽出した。尚、被験物質(化合物3) (最終濃度100nM)はUVB照射の15時間前に細胞に添加した。

【0042】(b) cDNAの合成とRT-PCR Takara(株)のRNA PCRキットを用いて逆転写及びPCRを行った。トータルRNA (500ng/3.5 μ l) (3.5 μ l), 25mM MgCl₂ (4 μ l), 10 \times PCRバッファー (100mM Tris-HCl (pH8.3), 500mM KCl) (2 μ l), dNTP混合物(2.5mM) (8 μ l), RNaseインヒビター

(40U/ μ l) (0.5 μ l), リバース トランスクリプターゼ (5U/ μ l) (1 μ l), オリゴ d(T)18 (50pmol/ μ l) (1 μ l)をPCRチューブ中で混合し、サーマルサイクラーを用い、42 $^{\circ}$ Cで60分間、52 $^{\circ}$ Cで30分間、99 $^{\circ}$ Cで5分間、4 $^{\circ}$ Cで10分間反応を行いcDNAを合成した。PCRはcDNA (4 μ l), 25mM MgCl₂ (4 μ l), 10 \times PCRバッファー (1.6 μ l), H₂O (11.1 μ l), Taqポリメラーゼ (5U/ μ l) (0.1 μ l), Redi Load (2 μ l), 20uMプライマー-F, R (各0.2 μ l)を混合し、サーマルサイクラーを用い、(1) 94 $^{\circ}$ Cで1分間、(2) 94 $^{\circ}$ Cで1分間、60 $^{\circ}$ Cで2分間、72 $^{\circ}$ Cで90秒間を1サイクルとしこれを所定の回数(15~40サイクル)繰り返してDNAを増幅し、(3) 4 $^{\circ}$ Cで反応を行った。PCR増幅産物は1.5%アガロース/TAEゲル電気泳動(200V, 30分間)に供し、0.3 μ l/ml EtBr/TAEで30分染色、H₂Oで15分間洗浄した後、FM-BIO (日立製)により解析した。この時、各バンドの濃さを測定し、UVB未照射の値と、照射時の値から各物質で処理した場合の各遺伝子の発現の程度をmRNAを抑制率として算出した。抑制率は無刺激時を100、刺激時を0として算出した。その結果を表2に示す。

【0043】

【表2】

	IL-6*	LI-8*	iNOS*	COX-2*
ケラチノサイトにおけるmRNA発現抑制率(%)	50	34	80	64

【0044】* : プライマー配列

IL-6-F : ATGAACCTCCTTCTCCACA

AGCGC

IL-6-R: GAAGAGCCCTCAGGCTGG
ACTG

(Nature 324, 73-(1986))

IL-8-F: ATGACTTCCAAGCTGGCC
GTGGCT

IL-8-R: TCTCAGCCCTCTTCAAAA
ACTTCTC

(Cytokine 1,2-(1986))

iNOS-F: CGGTGCTGTATTTCTTA
CGAGGCGAAGAAGG

iNOS-R: GGTGCTGCTTGTTAGGAG
GTCAAGTAAAGGGC

(Proc. Natl. Acad. Sci., 90, 3491-(1993))

COX-2-F: TTCAAATGAGATTGTGG
GAAAT

COX-2-R: AGATCATCTCTGCCTGA
GTATCTT

(J. Biol. Chem., 269, 11769-(1994))

【0045】この結果、本発明のリグナン類が優れた炎症性メディエーター遺伝子発現調節作用を有することが判明した。

【0046】試験例3 ノーザンブロットによる細胞接着分子mRNA発現量の解析:

血管内皮細胞における細胞接着分子mRNAの発現とリグナン類の効果につきノーザンブロットにより解析した。

(a) 血管内皮細胞の調製

コラーゲン(I)コートしたT-75フラスコ内にてE-300培地中でコンフルエントとなった正常ヒト臍帯由来血管内皮細胞に、被験物質(化合物3:最終濃度10nM)を添加する。15時間後にヒトTNF α を最終濃度1.25ng/mlとなるよう添加し、3時間培養する。培養液除去後PBS(-)にて洗浄し、Invitrogen社製

(組成)

化合物3

ブドウ糖

【0052】実施例2 注射剤

下記成分を注射用蒸留水5mlに溶解し、加熱滅菌して注

(組成)

化合物3

没食子酸オクチル

ブドウ糖

【0053】実施例3 ローション

下記成分を常法に従って混合し、ローションを製造し

(組成)

化合物1

グリセリンモノステアレート

エタノール

プロピレングリコール

Micro-Fast Track mRNA Isolationキットを用いてPoly-A⁺RNAを単離した。

【0047】得られたmRNAはアガロースゲル電気泳動に供した後、Hybond-N⁺ ナイロン膜(アマシャム社製)に転写、UV固定を行いフィルターを作成した。次いで鮭精子DNAで6時間プレハイブリダイゼーションを行った後、ELAM-1, ICAM-1GAPDH(Takara(株)製)の³²P-cDNAプローブと42℃で18時間ハイブリダイズした。終了後フィルターは2X-SSC-0.2%SDS溶液にて洗浄し、BAS2000によりmRNA発現量を解析した。この時、各バンドの濃さを測定し、UVB未照射の値と、照射時の値から各物質で処理した場合の各遺伝子の発現の程度を抑制率として算出した。その結果を表3に示す。

【0048】

【表3】

	ELAM-1	ICAM-1
血管内皮細胞におけるmRNA発現抑制率(%)	56	50

【0049】この結果、本発明のリグナン類が優れた細胞接着分子遺伝子発現抑制作用を有することが判明した。

【0050】以上のように、本発明のリグナンは優れたNF- κ B活性化抑制作用と、炎症及び癌転移に深く関与する遺伝子の発現調節作用を有しており、それに基づき抗ヒト免疫不全ウイルス剤、炎症の予防・改善剤、成人病予防剤、癌転移抑制剤として有効に用いることができる。

【0051】実施例1 注射剤

下記成分を注射用蒸留水5mlに溶解し、加熱滅菌して注射剤を製造した。

(mg)

15

100

注射剤を製造した。

(mg)

15

15

100

た。

(g)

1

1

15

4

イソプロピルパルミテート	3
ラノリン	1
セラミド	0.5
パラオキシ安息香酸メチル	0.1
ビタミンC	0.5
香料	微量
色素	微量
精製水	72

【0054】実施例4 錠剤

mgの錠剤を製造した。

下記成分を用い、常法に従って、直径9mm、重量200

(組成)	(g)
化合物1	1000
ヒドロキシプロピルセルロース	800
軽質無水ケイ酸	200
乳糖	500
結晶セルロース	500
タルク	500

【0055】実施例5 硬カプセル剤用充填薬剤

剤を製造した。

下記成分を用い、常法に従って、硬カプセル剤用充填薬

(組成)	(g)
化合物2	1000
結晶セルロース	1000
乳糖	1500
軽質無水ケイ酸	200

【0056】実施例6 顆粒剤

下記成分を用い、常法に従って、顆粒剤を製造した。

(組成)	(g)
化合物1	200
乳糖	200
ヒドロキシプロピルセルロース	300
タルク	15

【0057】実施例7 クリーム

下記成分を常法に従って混合し、クリームを製造した。

(組成)	(重量%)
化合物3	1.0
コレステロール	0.5
コレステリルイソステアレート	1.0
ポリエーテル変性シリコーン	1.5
環状シリコーン	20.0
メチルフェニルポリシロキサン	2.0
メチルポリシロキサン	2.0
硫酸マグネシウム	0.5
ビタミンC	0.2
55%エタノール	5.0
カルボキシメチルキチン	0.5
精製水	残量

計 100.0

【0058】実施例8 軟膏

下記成分を常法に従って混合し、軟膏を製造した。

(組成)	(重量%)
化合物3	3
コレステリルイソステアレート	3
流動パラフィン	10

α-トコフェロール	0.1
グリセリルエーテル	1
グリセリン	10
白色ワセリン	残 量
計	100.0

【0059】実施例9 クリーム

下記成分を常法に従って混合し、クリームを製造した。

(組成)	(重量%)
化合物4	1.0
コレステロール	0.5
コレステリルイソステアレート	1.0
ポリエーテル変性シリコーン	1.5
環状シリコーン	20.0
メチルフェニルポリシロキサン	2.0
メチルポリシロキサン	2.0
硫酸マグネシウム	0.5
55%エタノール	5.0
カルボキシメチルキチン	0.5
グリチルリチン酸ジカリウム	0.5
精製水	残 量
計	100.0

【0060】実施例10 錠剤

下記成分を用い、常法に従って錠剤を製造した。

(組成)	(mg)
化合物3	20
デンプン	130
ステアリン酸マグネシウム	10
乳糖	40
計	200

【0061】実施例11 錠剤

200mgの錠剤を製造した。

下記成分を均一に混合し、打錠機にて圧縮成型して1錠

(組成)	(g)
コーンスターチ	44.0
結晶セルロース	40.0
カルボキシメチルセルロースカルシウム	5.0
軽質無水ケイ酸	0.5
ステアリン酸マグネシウム	0.5
化合物3	10.0
計	100.0

【0062】実施例12 錠剤

の残量を加えて混合し、打錠機にて圧縮成型して1錠2

下記処方に従い、(1)、(4)及び(2)の一部を均一に混合して圧縮成型した後粉碎し、(3)及び(2)

(組成)	(g)
(1) 結晶セルロース	84.5
(2) ステアリン酸マグネシウム	0.5
(3) カルボキシメチルセルロースカルシウム	5.0
(4) 化合物1	10.0
計	100.0

【0063】実施例13 顆粒剤

造粒後、乾燥し、篩別して、顆粒剤を製造した。

下記成分を均一に混合し、捏和し、押出し造粒機により

(組成)	(g)
結晶セルロース	55

10%ヒドロキシプロピルセルロース

エタノール溶液

35

化合物4

10

計

100

【0064】実施例14 カプセル剤

填した。

下記成分を均一に混合し、200mgを2号カプセルに充

(組成)

(g)

コーンスターチ

89.5

軽質無水ケイ酸

0.5

化合物3

10.0

計

100.0

【0065】実施例15 注射剤

れに(2)と(4)の溶液を加えて乳化し、注射剤を製造した。

下記処方に従い、(5)を(1)及び(3)溶解し、こ

(組成)

(g)

(1)大豆油

5.0

(2)注射用蒸留水

89.5

(3)大豆リン脂質

2.5

(4)グリセリン

2.0

(5)化合物3

1.0

計

100.0

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

FI

A61K 31/36

ACS

A61K 31/36

ACS

ACV

ACV

ADA

ADA

ADU

ADU

ADY

ADY

AGZ

AGZ

C07D 493/04

101

C07D 493/04

101A